

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С ИНГИБИТОРАМИ ПРОТЕАЗ

В.П. ЧЕХОНИН<sup>2</sup>, Е.Б. МАЗО<sup>1</sup>, И.А. РЯБУХИН<sup>2</sup>, М.Э. ГРИГОРЬЕВ<sup>1</sup>

Российский Государственный медицинский университет<sup>1</sup>, Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В. П. Сербского<sup>2</sup>, г. Москва

Исследование процесса комплексообразования ПСА с ингибиторами сывороточных протеаз, путем применения для этих целей высокоочищенных компонентов, подтвердил точку зрения о возможности существования в сыворотке крови комплексов ПСА с  $\alpha_2$ -макроглобулином и  $\alpha_1$ -антихимотрипсином. Разработанные иммуноферментные тест-системы для анализа ПСА так и его комплексов с ингибиторами протеаз позволили установить средненормальные уровни ПСА, а также его комплексов в сыворотке крови здоровых доноров. Анализ полученных результатов, а также данные других исследователей Oesterling M. [6] и Liĭja H. [12, 13], дают основание предположить, что комплексный количественный анализ как ПСА, так и его комплексов с ингибиторами протеаз может быть использован в ранней диагностики рака простаты и его дифференциальной диагностики с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, причем эффективность комплексного подхода может быть информативнее, чем определение только общего ПСА.

**Ключевые слова:** рак простаты, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, простатический специфический антиген.

**Введение.** Первым органоспецифическим маркером, получившим широкое признание в клинко-лабораторной практике был *Простатический Специфический Антиген* (ПСА), описанный Wang M. [1]. Данный антиген представляет собой гликопротеид, синтезируемый эпителиальными клетками предстательной железы (ПЖ), а в функциональном отношении он обладает активностью каллекреин-подобной сериновой протеазы [2, 3], способной изменять и контролировать коагуляционные свойства семенной плазмы [4, 5].

Несмотря на то, что анализ ПСА в сыворотке крови широко используется для ранней диагностики первичного рака ПЖ, мониторинга динамики заболевания, оценки эффективности проводимой терапии, а также для диагностики ранних рецидивов после радикальной терапии первичного рака простаты, его ценность при скрининге рака простаты остается неоднозначной. Одной из проблем при исследовании сывороточного ПСА является наличие изоформ ПСА в виде комплексов с ингибиторами протеаз, прежде всего, с  $\alpha_1$ -антихимотрипсином и  $\alpha_2$ -макроглобулином [6, 5], которые не обнаруживаются при использовании стандартных иммуноферментных тест-систем. Кроме того, очищенный ПСА необходим для стандартизации процедур при разработке метода альтернативного иммуноферментного анализа ПСА в сыворотке крови больных раком простаты.

Впервые ПСА был выделен из ткани простаты Wang M. [1], а впоследствии и другими авторами [2, 7, 8] из семенной плазмы. При этом ПСА, полученный из двух источников оказался полностью иммунохимически и биохимически идентичным. В то же время, концентрация ПСА в семенной плазме оказалась значи-

тельно выше, чем в соответствующем экстракте из ткани ПЖ и в среднем равнялась 700 мкг/мл. Анализ литературных источников позволил нам сделать вывод о том, что существующие способы получения гомогенного ПСА, за исключением технологии Huber P. [9], который использовал для выделения ПСА изоэлектрическое фокусирование в 8 М мочеvine, базируются на последовательном применении различных хроматографических методов. Нет сомнения в том, что данные методы обладают рядом технических преимуществ для получения гомогенных препаратов, однако требуют для улучшения качества препарата использования коммерческих ингибиторов протеаз. Особо остро этот вопрос встал после серии публикаций Lilja H. и соавторов [10, 12, 12, 13] относительно существования высокомолекулярных форм ПСА в сыворотке крови, представляющих собой комплексы ПСА с  $\alpha_1$ -антихимотрипсином и  $\alpha_2$ -макроглобулином.

Целью данной работы явилось иммунохимическое изучение ПСА и его высокомолекулярных форм, изучение их физико-химических свойств и химической характеристики, а также разработка способов иммунохимического анализа в биологических жидкостях.

**Методика.** ПСА получали по методу Wang M. [1], под контролем моноспецифических антисывороток к ПСА, любезно предоставленных д.м.н. А.Н. Николаевым [14].

Моноспецифические антисыворотки против ПСА были получены при иммунизации кроликов породы Шиншилла препаратом ПСА после трехкратной реиммунизации.

**Исследование процессов комплексообразования ПСА с экстрацеллюлярными ингибиторами протеаз.** С целью исследования способности образовывать комплексы с известными ингибиторами протеаз, смешивали 100 мкг ПСА с 1 мг  $\alpha_1$ -антихимотрипсина ( $\alpha_1$ -АХТ) и 1 мг  $\alpha_2$ -макроглобулина ( $\alpha_2$ -МГ). Белковую смесь инкубировали в течение 24 часов при температуре 37° С в 50 mM ТРИС-НСI буфере (рН 8,0), содержащем 0,1 М NaCl и анализировали методом диск-электрофореза в ПААГ с SDS с последующей окраской Кумасси R-250 или иммунопроявлением. Образовавшиеся комплексы регистрировали при иммунопроявлении с помощью анти-ПСА-антител, а также поликлональных антисывороток к  $\alpha_1$ -АХТ (фирма "Dako", Copenhagen) и  $\alpha_2$ -МГ (фирма "Calbiochem").

Молекулярную массу полученных высокомолекулярных форм ПСА определяли методом гель-фильтрации на Сефадексе G-200 и G-100, при помощи стандартных китов (фирма "Serva", США).

Иммунизацию кроликов препаратами высокомолекулярных форм ПСА (ПСА- $\alpha_1$ -АХТ, ПСА- $\alpha_2$ -МГ), проводили после их разделения методом гель-хроматографии на Sephacryl S-300. Анализ полученных антисывороток проводили методами перекрестного иммуноэлектрофореза по Laurell O. (15) и при иммунопроявлении столбиков геля, полученных при электрофорезе указанных препаратов в ПААГ с SDS. Препараты высокоочищенных антител к комплексам ПСА- $\alpha_1$ -АХТ, ПСА- $\alpha_2$ -МГ и ПСА получали из моноспецифических антисывороток по методу Weir D. [20]. Иммуноферментный анализ ПСА и его высокомолекулярных форм проводили при помощи "сэндвич"-варианта иммуноферментного анализа (16).

**Результаты и обсуждение.** Иммунохимический анализ антисывороток, полученных при иммунизации и 3-х кратной реиммунизации препаратом, полученным по способу Wang M. [1] позволили идентифицировать в данных антисыворотках только один тип антител к ПСА (Рис. 1).

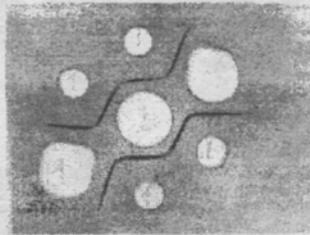


Рис. 1. Иммунодиффузионный анализ анти-ПСА-антисывороток с стандартной тест-системой к ПСА («Dako»).

1 - стандартные препараты ПСА, полученные по схеме Wang; 2 - анти-ПСА-антисыворотка (от Николаева А.Н.); 3 - стандартный препарат анти-ПСА-антител (фирма «Dako»); 4 - анти-ПСА-антисыворотка, полученная при иммунизации кроликов препаратом, выделенным по схеме Wang;

Как видно из рисунка, препарат ПСА, полученный по схеме Wang [1], обнаруживал в сыворотке крови кроликов, иммунизированных как описано выше, один тип антител к ПСА, идентичных стандартным (фирма «Dako», Copenhagen). Тест-система, сконструированная нами на основе полученных антисывороток и препарата ПСА, имела предел чувствительности 1,8 мкг/мл и позволяла идентифицировать данный антиген в биологических жидкостях и экстрактах из ткани предстательной железы. При проверке специфичности данной тест-системы отсутствовали перекрестные иммунохимические реакции между белками сыворотки крови человека, а также экстрактами органов и тканей здорового человека. Под контролем данной тест-системы нами была исследована способность ПСА к комплексообразованию с экстрацеллюлярными ингибиторами протеаз: к таким как  $\alpha_1$ -АХТ и  $\alpha_2$ -МГ. Инкубирование 100 мкг ПСА с избытком каждого из вышеуказанных ингибиторов в течение суток приводило к связыванию эквимольных количеств. Иммунохимический и биохимический анализ реакционной смеси показал наличие в них незначительных количеств ПСА, свободных от ингибиторов протеаз, а также комплексов ПСА- $\alpha_1$ -АХТ (молекулярная масса  $92 \pm 8$  kD) и ПСА- $\alpha_2$ -МГ (молекулярная масса  $190 \pm 10$  kD). Выделенные при гель-хроматографии комплексы ПСА с ингибиторами протеаз были использованы нами с целью получения специфических антисывороток. Иммунизация кроликов препаратами данных комплексов с последующей реиммунизацией дала возможность получить антисыворотки к вышеуказанным комплексам (Рис. 2, 3).

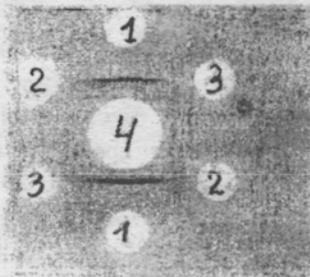


Рис. 2. Иммунодиффузионный анализ комплекса ПСА- $\alpha_1$ -АХТ и соответствующих антисывороток

1 - стандартный препарат ПСА, полученные по схеме Wang М.; 2 - препарат ПСА- $\alpha_1$ -АХТ; 3 - препарат  $\alpha_2$ -МГ; 4 - антисыворотка, полученная при иммунизации комплексом ПСА- $\alpha_1$ -АХТ; 5 -  $H_2O$ ;

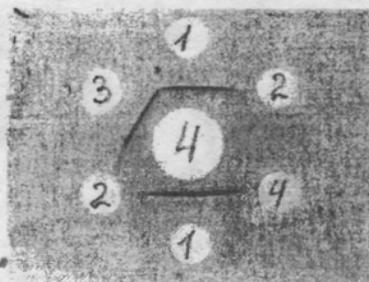


Рис. 3. Иммунодиффузионный анализ комплекса ПСА  $\alpha_2$ -МГ и соответствующих антисывороток

- 1 - стандартный препарат ПСА, полученные по схеме Wang M.;  
 2 - препарат  $\alpha_1$ -АХТ;  
 3 - препарат ПСА- $\alpha_2$ -МГ;  
 4 - антисыворотка, полученная при иммунизации комплексом ПСА- $\alpha_1$ -МГ;  
 5 -  $H_2O$ ;

Анализируя данные рисунки следует сделать вывод о том, что иммунизация препаратом комплекса ПСА- $\alpha_1$ -АХТ дает возможность получать антисыворотки, содержащие антитела 2-х типов: к ПСА и к  $\alpha_1$ -АХТ. К сожалению, нам не удалось получить антисыворотки, содержащие антитела к специфической детерминанте данного комплекса, которая возникает в результате образования комплексов.

Более обещающими оказались результаты получения антисывороток к комплексу ПСА- $\alpha_2$ -МГ. В данном случае антисыворотки содержали так же два типа антител, однако один из них оказался специфичным для комплекса ПСА- $\alpha_2$ -МГ, второй тип антител связывался с  $\alpha_2$ -МГ. Здесь крайне важно отметить тот факт, что при иммунизации комплексом ПСА- $\alpha_2$ -МГ нами была использована температурная модификация данного комплекса, смысл которой сводился к инкубации данного комплекса при температуре  $+ 60^\circ C$ , в течение одного часа. Таким образом, нам удалось получить иммуногенно активную форму комплекса ПСА- $\alpha_2$ -МГ, способную при иммунизации стимулировать образование специфических антител к данному комплексу. Резюмируя вышесказанное следует отметить тот факт, что практически отсутствует сомнение о способности ПСА образовывать комплексы с соответствующими экстрацеллюлярными ингибиторами протеаз. В то же время, наличие специфических антител к комплексу ПСА- $\alpha_2$ -МГ открыло перед нами возможность анализировать их в биологических жидкостях и экстрактах предстательной железы.

Что касается количественного анализа комплекса ПСА- $\alpha_1$ -АХТ, мы встретились с определенными трудностями при анализе, однако решили данный вопрос, применив стратегию Christensson A. и соавт. [17], которые рекомендовали для этой цели своеобразный вариант иммуноферментного метода, используя в качестве посадочных антител антитела к ПСА, а в качестве конъюгат-формирующих антител - антитела к  $\alpha_1$ -АХТ, которые в отличие от методики Christensson A. мы конъюгировали с пероксидазой VI типа ("Sigma", США) по способу Nakane P. [18]. При этом для активации планшета мы использовали анти-ПСА-антитела в концентрации 0,003 %, а соответствующий конъюгат анти- $\alpha_1$ -АХТ-антител с пероксидазой в разведении 1: 100. Калибровочная кривая для определения комплекса ПСА- $\alpha_1$ -АХТ представлена на рис. 4.

Таким образом мы получили возможность количественного определения как ПСА, так и его комплексов с экстрацеллюлярными ингибиторами протеаз.

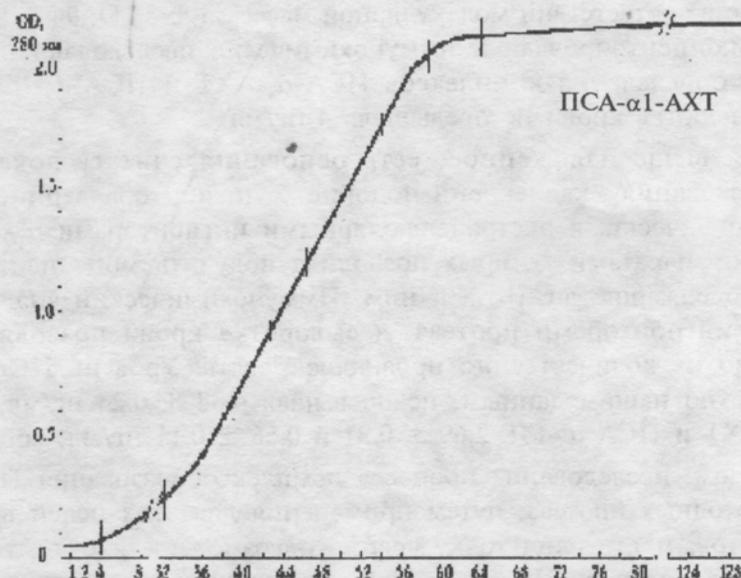


Рисунок 4. Калибровочная кривая для определения комплекса ПСА- $\alpha_1$ -АХТ

В соответствии с целями данной работы, нами было проведено изучение некоторых физико-химических свойств ПСА и его комплексов. Результаты исследования приведены в таблице.

Физико-химические свойства ПСА, ПСА-АХТ, ПСА-МГ

Таблица

№	свойства	ПСА	ПСА-АХТ	ПСА-МГ
1	электрофоретическая подвижность	$\beta$ -глобулина	$\alpha_1$ -глобулина	$\alpha_2$ -глобулина
2	молекулярная масса, измеренная методом гель-фильтрации	$37 \pm 3,5$ kD	$94 \pm 8,2$ kD	$220 \pm 12$ kD
3	изоэлектрическая точка	6,9	6,8	7,1

Как видно из представленной таблицы, образование комплексов ПСА с экстрацеллюлярными ингибиторами протеаз приводит к появлению биологически активных соединений, характеризующихся биологическими свойствами, отличными от нативного ПСА, причем молекулярная масса возрастает сравнимо с молекулярной массой соответствующих ингибиторов. Электрофоретическая подвижность комплексов также соответствует подвижности ингибиторов. Комплексы химически весьма устойчивы и сохраняется в присутствии 2 % SDS и 6 М мочевины.

На заключительном этапе работы мы использовали разработанные тест-системы для анализа ПСА и его комплексов с ингибиторами протеаз. С этой целью

сливную сыворотку в количестве 10 мл донора (по 50 мкл от 100 здоровых мужчин в возрасте до 35 лет и 100 здоровых женщин) концентрировали лиофилизацией в 5 раз после чего растворяли в 2 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7.4) и подвергали гель-хроматографии отбирая белковые фракции элюирующие в свободном объеме, а также в соответствии молекулярной массе  $35 \pm 5$  kD,  $94 \pm 8$  kD. Отобраные фракции концентрировали и иммунохимически исследовали на предмет количественного определения комплексов ПСА- $\alpha_1$ -АХТ и ПСА- $\alpha_2$ -МГ. Концентрация ПСА в сыворотке крови не превышала 4 нг/мл.

Резюмируя выше изложенное, есть основания считать доказанным факт комплексообразования каллекреин-подобного ингибитора сериновой протеазы ПСА с неспецифическими экстрацеллюлярными ингибиторами  $\alpha_1$ -АХТ и  $\alpha_2$ -МГ, иммунизация препаратами которых позволила получить моноспецифические антисыворотки содержащие антитела к ним. Иммунохимический анализ ПСА и его комплексов с ингибиторами протеаз, в сыворотке крови позволяет надежно и воспроизводимо их количественно проанализировать. Уровень ПСА в сыворотке крови доноров, по нашим данным, не превышал  $4.32 \pm 0.23$  нг/мл, а концентрация ПСА- $\alpha_1$ -АХТ и ПСА- $\alpha_2$ -МГ  $2.69 \pm 0.31$  и  $0.56 \pm 0.11$  нг/мл, соответственно.

Таким образом, исследование процесса комплексообразования ПСА с ингибиторами сывороточных протеаз, путем применения для этих целей высокоочищенных компонентов, подтвердил точку зрения о возможности существования в сыворотке крови комплексов ПСА с  $\alpha_2$ -макроглобулином и  $\alpha_1$ -антихимотрипсином. Разработанные иммуноферментные тест-системы для анализа ПСА так и его комплексов с ингибиторами протеаз позволили установить средненормальные уровни ПСА, а также его комплексов в сыворотке крови здоровых доноров. Анализ полученных результатов, а также данные других исследователей Oesterling M. [6] и Lilja H. [12, 13], дают основание предположить, что комплексный количественный анализ как ПСА, так и его комплексов с ингибиторами протеаз может быть использован в ранней диагностики рака простаты и его дифференциальной диагностики с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, причем эффективность комплексного подхода может быть информативнее, чем определение только общего ПСА.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Wang M.C., Valenzuela L.A., Murphy G.P., Chu T.M., Invest. Urol 1979, 79, 159-163.
- 2 Lilja, H., J.Clin. Invest. 1985, 76, 1899-1903.
- 3 Watt K.W.K., Lee P.J., M'Timkulu, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1986, 83, 3166-3170.
- 4 Christensson, F., Laurell, C.D., Lilja, H., Eur. J. Biochem. 1990 194, 755-763.
- 5 Lilja, H., Christensson, F., Dahien, U. et al. Clin. Chem. 1991, 37, 1618-1625.
- 6 Joseph E. Oesterling, M.D. Molecular PSA: The next frontier in PSA screening. Contemporary Urology april. 1996, v. 8, № 4
- 7 Schaller, J., Akiyama, K., Tsuda, R. et al. Eur. J. Biochem 1987, 170, 111-120.
- 8 Wang, M. C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T. M., Oncology 1982, 39, 1-5.
- 9 Huber P.R., Schell Y., Scand.J.Urol.Nephrol., 1987, 104, 33-39.
10. Christensson A., Lilja H. Eur J Biochem 1994 - 487 (in press).
11. Lilja H., Christensson A., Dahlen U. Et al. Clin Chem 1991, 37. 1618-25.
12. Lilja H. Cockett A.T.K., Abrahamsson P.A. Cancer 1992, 70, 230-4.
13. Per-Anders Abrahamson and Hans Lilja. Tumor Marcer Update 1994; 6: 1-4.
14. Николаев А.Н., Автореф. дисс. ... док. мед. наук., 1993 г.
15. Laurell C.B. Anal. Biochem., 1965. - v.10 - p. 359-362.

16. Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. Bull. WHO, 1976 - v. 53 - p. 55-65.
17. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, et al. J. Urol., 1993; 150: 100-105
18. Nakane P.K., Kawaoi A. J. Histochem. Cytochem. - 1974 - v. 22 - p. 1084-1091.
19. Weir D., Handbook of Experimental Immunology Oxford, 1978.

IDENTIFICATION PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN AND ITS COMPLEXES WITH PROTEASE INHIBITORS

*V.P. Chekhonin<sup>2</sup>, E.B. Mazo<sup>1</sup>, I.A. Rjabukhin<sup>2</sup>, M.E. Grigorev<sup>1</sup>.*

*Russian State Medical University<sup>1</sup>, Laboratory of Immunochemistry, Serbsky National Research Center for Social and Forensic Psychiatry<sup>2</sup>, Moscow.*

The study of the PSA complexes with the protease inhibitors has confirmed the opinion of possible existence the complexes of the PSA with  $\alpha_2$ -macroglobulins and  $\alpha_1$ -antihymotripsines in blood serum.

The immunoenzyme analysis of the PSA and its complexes has made it possible to establish the normal level of the PSA and corresponding complexes in donors blood serum. There are reasons to suppose, that the quantitative analysis of the PSA and its complexes with the protease inhibitors can be used for the early diagnosis of PC and its differential diagnosis with the prostate benign hyperplasia. In our opinion, the effect of the complex approach can be more informative than the ordinary PSA detection.

**Key words:** benign prostatic hyperplasia; prostate cancer; prostate specific protein.